

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На редовној седници Наставно - научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 11. 05. 2017. године, одређени смо за чланове комисије за преглед и оцену докторске дисертације Драгице Спасојевић, дипломираног биохемичара, пријављене под насловом: „**Модификација алгината, целулозе и ксилана из ћелијског зида биљака, фенолним једињењима и аминима, за добијање хидрогелова**“. На основу прегледане дисертације подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Драгице Спасојевић под наведеним насловом написана је на 92 страна формата А4, проред 1,5. Садржи 42 слике и графичка приказа и 8 табела. Рад обухвата следећа поглавља: 1. Увод (2 стране), 2. Преглед литературе (27 страна), 3. Експериментални део (15 страна), 4. Резултати и дискусија (30 страна), 5. Закључак (2 стране), 6. Литература (12 страна, 123 цитата) и 7. Биографија (1 страна). Поред наведеног теза садржи извод на српском и енглеском језику (2 стране и 2 стране), садржај (3 стране), захвалницу (1 страна), листу скраћеница (2 стране) као и потребне изјаве у складу са захтевима за репозиторијум (3 стране).

У **Уводу** је дат краћи осврт на област истраживања хидрогелова добијених од природних полисахарида ћелијског зида као што су алгинат, целулоза и ксилан. Описана је актуелност теме и њен значај за имобилизацију ензима, контролисано отпуштање лекова и ткивни инжињеринг. Дефинисани су предмет и циљ докторске дисертације, а то је употреба природних полимера ћелијског зида: алгината, целулозе и ксилана за добијање хидрогелова и њихова употреба за имобилизацију ензима, контролисано отпуштање лекова и третирање отворених рана.

У **Прегледу литературе** кандидат наводи опште појмове о биљним полимерима ћелијског зида, алгинату, целулози и ксилану, њиховим особинама, структури и примени. Посебан осврт је дат на хемијске модификације ових полимера, које се најчешће помињу у литератури. Такође су описани начини прављења хидогелова, њихов значај и могућности примене.

Експериментални део садржи детаљан опис експерименталних процедура, материјала и реагенса коришћених у оквиру ове докторске дисертације. Описани су експериментални услови пречишћавања и модификације биополимера, имобилизације ензима и карактеризације добијених ензимских имобилизата, као и имобилизација активних супстанци и тестирање њиховог потенцијала за практичну примену у контролисаном отпуштању код превијања рана и оралној примени.

У поглављу **Резултати и дискусија** кандидат износи главне резултате својих истраживања, анализу и дискусију тих резултата, као и поређење са до сада доступном литературом. Ово поглавље је подељено у 4 дела. У првом делу су наведени резултати тестирања четири различита имобилизата пероксидазе из рена у куглицама нативног и хемијски модификованог алгината. У другом делу су приказани резултати антимикробне активности дехидрогенатних полимера кониферола у алгинатном хидрогелу. У трећем делу су приказани резултати структурне карактеризације полимера тирамин-ксилана различитог степена модификације са тирамином као и његова примена у имобилизацији ензима глукоамилазе. У четвртном делу овог поглавља су описани модификати карбоксиметил-целулозе тирамином и њихова примена у контролисаном отпуштању лека кетопрофена.

У поглављу **Закључци** су сумирани и укратко описани најзначајнији закључци који су проистекли из резултата ове докторске дисертације.

У поглављу **Литература** су наведена 123 цитираних радова из области истраживања која исцрпно покривају све делове дисертације.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

У овој дисертацији полимери ћелијског зида биљака (алгинат, целулоза и ксилан) модификовани су перјодатном оксидацијом и редуктивном аминацијом аминима и фенолним једињењима у циљу добијања хидрогелова погодних за имобилизацију и енкапсулацију макромолекула и малих активних молекула.

У првом делу дисертације модификати алгината су тестирани у реакцијама добијања хидрогелова јонотропним гелирањем јонима калцијума, у циљу што ефикасније имобилизације пероксидазе из рена. Поређени су имобилизати добијени гелирањем нативног алгината и ензима, и гелирањем модификата алгината и пероксидазе добијеним перјодатном оксидацијом и редуктивним аминовањем у присуству диаминa, како би се пронашао што активнији и стабилнији имобилизат ензима за употребу у шаржном реактору. Имобилизат перјодатно оксидованог алгината и пероксидазе модификоване диаминима је показао највећу активност, коју је у односу на нативан ензим задржао у много већој мери и у органском растварачу и у базним растворима.

У другом делу дисертације синтетисаним лигнинским полимерима (ДХП) тестирана је антибактеријска активност на сојевима бактерија које се најчешће срећу у хроничним ранама. ДХП су инкапсулирани у алгинатни хидрогел где су показали антибактеријску активност која је била боља или упоредива са два комерцијална антибиотика као што су ампицилин и стрептомицин.

У следећем делу дисертације је изолован и карбоксиметилован ксилан из чокова кукуруза, а затим је у реакцијама перјодатне оксидације и редуктивне аминације тирамином добијена серија деривата ксилана, степена модификације од 5 до 20%, који у реакцији умрежавања са пероксидазом дају хидрогелове. Добијени модификати ксилана су окарактерисани спектроскопским методама (UV-Vis и FTIR) и кисело-базном титрацијом, а реакција умрежавања и имобилизације ензима амилоглукозидазе је оптимизована у погледу концентрације модификованог полимера, степена модификације и концентрације ензима амилоглукозидазе. Ефикасност имобилизације је одређена мерењем кинетичких параметара као што су специфична активност, принос имобилизације, температурна стабилност, стабилност у органском растварачу и отпорност на испирање током вишеструке употребе имобилизата у шаржном реактору.

У четвртом делу дисертације карбоксиметил-целулоза је такође перјодатно оксидована у различитим молским процентима и модификована тирамином у реакцији редуктивне аминације. Добијена серија модификата је структурно окарактерисана спектроскопским методама и кисело-базном титрацијом. Модификована целулоза је тестирана као носач за инкапсулацију лека кетопрофена и његово контролисано отпуштање (drug delivery). Инкапсулацијом кетопрофена у тирамин-карбоксиметил-целулозном хидрогелу омогућено је његово ослобађање на рН вредности која одговара

лумену танког црева (7,4), док је на ниским рН вредностима (рН 1,5, што би одговарало рН вредностима у желуцу), лек у највећем проценту задржан у гелу.

В) Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Биополимери ћелијског зида биљака представљају обновљиве сировине, широко заступљене у природи. Њихова релативно лака доступност и ниска цена чине их изузетно погодним материјалима за прављење хидрогелова, а хидрогелови биополимера имају као предност биокомпатибилност, биодеградабилност, нетоксичност и мултифункционалност. Због тога се у последње време интензивно истражује њихова потенцијална примена у ткивном инжењерингу, имобилизацији ензима и ћелија, инкапсулацији и достављању лекова. Како би се побољшала физичко-хемијска својства добијених хидрогелова и креирале жељене особине развијају се бројне методе модификације биополимера. Најчешће коришћене реакције за модификацију полисахарида су перјодатна оксидација, естерификација и реакција грађења амида уз помоћ карбодиимида.

У оквиру ове дисертације комбинацијом познатих хемијских реакција су синтетисани нови модификати полисахарида ћелијског зида алгината, ксилана и целулозе са јединственим особинама (повећана: растворљивост, хидрофилност, концентрација јонизабилних група и присуство и позитивне и негативне шарже у истом молекулу) у односу на до сада описане у литератури. Те нове особине модификованих полисахарида ћелијског зида биљака су успешно искоришћене за имобилизацију и енкапсулацију ензима и малих молекула.

У дисертацији су први пут тестиране четири различите комбинације нативног алгината и ензима, оксидованог и аминованог алгината и оксидоване и аминоване пероксидазе. Утврђено је да имобилизат аминоване пероксидазе на оксидованом алгинату има најбоља својства од тестираних имобилизата и да у односу на сличне имобилизате доступне у литератури има рН оптимум померен ка базнијим вредностима, што може бити предност у индустријској употреби.

Резистентност патогених бактерија на постојеће антибиотике постаје све већи здравствени проблем, те су стога полимери конеферил алкохола по први пут имобилисани у алгинату и тестирани на бактеријама присутним у ранама пацијената. На три тестирана бактеријска соја антибактеријска активност овог имобилизата је боља од комерцијалних антибиотика стрептомицина и ампицилина, док је на осталим

сојевима у рангу ових антибиотика или нешто виша. Антимикробна активност полимера кониферил алкохола унутар хидрогела са алгинатом је у овој дисертацији доказана и на грам негативним и на грам позитивним сојевима, док је у досадашњим радовима у литератури то било доказано само у случају неких грам позитивних микроорганизама. Све ово указује на потенцијалну могућност употребе добијених хидрогелова у третману отворених рана као антимикробног средства.

Детаљна испитивања нових аминок-фенолних модификата карбоксиметил-ксилана и карбоксиметил-целулозе различитих степена модификације су показала да имају побољшане особине у односу на до сада описане фенолне модификате полисахарида. Увођење аминок групе у полисахарид заједно са фенолном, уз задржавање присуства слободних карбоксилних група је значајно побољшало способност гелирања и растворљивост добијених модификата полисахарида у односу на сличне тирамидне модификате карбоксиметил-целулозе и алгината описане у литератури. Захваљујући тим особинама су успешно оптимизовани услови за имобилизацију амилоглукозидазе на тирамин-карбоксиметил-ксиланским микрокуглицама. На овај начин модификована целулоза је такође успешно примењена за специфично, рН зависно достављање кетопрофена. Отпуштање свега 10% апсорбованог лека за 4 сата на рН вредности која одговара желудачном соку, а 80% лека на рН вредности која одговара оној у танком цреву, указује на могућу примену тирамин-карбоксиметил-целулозе као „паметног“ хидрогела, који може да одговара на промене услова у спољашњој средини.

Г) Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

Рад објављен у врхунском часопису међународног значаја (M21)

Д. Спасојевић, Д. Змејкоски, Ј. Гламочлија, М. Николић, М. Соковић, В. Милошевић, И. Јарић, М. Стојановић, Е. Маринковић, Т. Барисан-Асенбауер, Р. Продановић, М. Јовановић, К. Радотић. Lignin model compound in alginate hydrogel: a strong antimicrobial agent with high potential in wound treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **48**: 732–735 (2016)

Рад објављен у часопису међународног значаја (M23)

Д. Спасојевић, М. Прокопијевић, О. Продановић, М. Г. Пиртеа, К. Радотић, Р. Продановић, Immobilization of chemically modified horse radish peroxidase within activated alginate beads. *Chemical Industry* 68: (1) 117–122 (2014)

Саопштење на међународном скупу штампано у целини (М33)

Д. Спасојевић, М. Прокопијевић, О. Продановић, К. Радотић Хаџи-Манић, Р. Продановић, Поређење две методе за имобилизацију ХРП у алгинату за пречишћавање отпадних вода, Научни Конгрес: Заштита природе у XXI вијеку, 20-23. Септембар, Жабљак 2011, Црна Гора, Зборник реферата, резимеа реферата и постер презентација (Књига БР2), 653-656 (2011).

Саопштење на националном скупу штампано у целини (М63)

Д. Спасојевић, М. Прокопијевић, О. Продановић, К. Радотић Хаџи-Манић, Р. Продановић, Поређење четири методе за имобилизацију ХРП у алгинату ради потенцијалне примене у пречишћавању отпадних вода, Научни Конгрес: 50. Јубиларно Саветовање Српског Хемијског Друштва, Београд 2012, Србија, Књига Радова, ИСБН: 978-86-7132-049-8, 199-202

Д) Закључак комисије

Комисија је након детаљног прегледа докторске дисертације кандидаткиње Драгице Спасојевић под насловом „**Модификација алгината, целулозе и ксилана из ћелијског зида биљака, фенолним једињењима и аминима, за добијање хидрогелова**“ закључила да је кандидаткиња успешно одговорила на све постављене задатке везане за модификацију полисахарида ћелијског зида и развој њихових хидрогелова за имобилизацију ензима и активних супстанци. Модификовани су алгинат и пероксидаза из рена који су након гелирања дали имобилизат ензима са побољшаним својствима за индустријску примену у оксидацији фенола у односу на растворни облик ензима. У оквиру дисертације је први пут тестирана антибактеријска активност дехидрогенатних полимера кониферил алкохола имобилисаних у алгинатном хидрогелу. Добијени хидрогелови су показали антимикробну активност на неколико бактеријских сојева у рангу комерцијалних антибиотика ампицилина и стрептомицина, што отвара могућност њихове употребе у третману отворених рана на кожи. Такође су синтетисани нови модификати ксилана изолованог из чокова кукуруза

и комерцијално доступне карбоксиметил-целулозе. Добијена је серија модификата са различитим процентом уведених функционалних група: аминок и фенолне, што је окарактерисано спектроскопским методама. Добијени модификати су захваљујући новим и побољшаним особинама као што су способност гелирања у присуству пероксидаза и пероксида, повећана концентрација јонизабилних група и повећана растворљивост у односу на нативне полисахариде успешно тестирани у реакцијама имобилизација глукоамилазе у микрокуглицама тирамин-карбоксиметил-ксиланског полимера, и инкапсулације и контролисаног отпуштања кетопрофена из тирамин-карбоксиметил-целулозног хидрогела.

Резултати истраживања, проистекли из ове дисертације објављени су у једном раду штампаном у врхунском међународном часопису (M21), једном раду штампаном у међународном часопису (M23) и у по једном саопштењу на скупу међународног (M33) и националног значаја (M63) штампано у целини.

Стога предлажемо Наставно-научном већу Хемијског факултета, Универзитета у Београду, да кандидаткињи Драгици Спасојевић одобри одбрану докторске дисертације под наведеним насловом.

У Београду, 06.07.2017.

Чланови комисије:

Др Радивоје Продановић, ванредни професор Хемијског
факултета Универзитета у Београду, ментор

Др Ксенија Радотић Хаџи-Манић, научни саветник
Института за мултидисциплинарна истраживања
Универзитета у Београду

Др Владимир Бешкоски, ванредни професор Хемијског
факултета Универзитета у Београду
